

CLIPPEDIMAGE= JP359203958A
PUB-NO: JP359203958A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 59203958 A
TITLE: REAGENT FOR MEASURING ALPHA1-PROTEINASE
INHIBITOR-CALLICREIN CONJUGATE
PUBN-DATE: November 19, 1984
INVENTOR-INFORMATION:
NAME
HAYAKAWA, SHINOBU
HIRANO, KAZUYUKI
SUGIURA, MAMORU
INT-CL_(IPC): G01N033/54; A61K039/44 ; C12Q001/00

US-CL-CURRENT: 435/4,435/7.4 ,435/7.94

ABSTRACT:

PURPOSE: To enable measurement of the α - 1 -protease inhibitor (α - 1 -PI) callicrein (K) conjugate in a human bodily fluid with high accuracy by using an antibody obtd. by marking the antibody of the human α - 1 -PI with enzyme and an insolubilized antibody of the antibody of the refined human gland K as a reagent.

CONSTITUTION: A marked antibody is obtd. by covalent bond of the α - 1 -PI antibody obtd. by immunizing the refined human α - 1 -PI as antigen to a house rabbit with enzyme such as β -galactosidase. On the other hand, an insolubilized K antibody deposited with the refined human gland callicrein antibody on an insoluble carrier such as a polystyrene bead is prepd. The insolubilized K antibody bead and the enzyme-marked α - 1 -PI antibody are brought into reaction with a bodily fluid such as a serum to be examined to cause a sandwich reaction with the α - 1 -PI.K conjugate in the bodily fluid. The bead is taken out after the reaction and is brought into reaction with the enzyme substrate. The activity of the enzyme is measured from the absorbancy of the color generated by the reaction of the substrate. The diagnosis of the

hepatitis is
thus made possible exactly as the concn. of the
α<SB>1</SB>-PI.K
increases in the case of the hepatitis.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japio

DID:
JP 59203958 A

DERWENT-ACC-NO: 1985-003475

DERWENT-WEEK: 198501

\~4-COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD\~14~

TITLE: Reagent for diagnosis of hepatitis - comprising purified human

adeno-kalli krein antibody bound to insoluble carrier and enzyme-labelling antibody

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1983JP-0078158 (May 6, 1983)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES MAIN-IPC

JP 59203958 A November 19, 1984

N/A

007

N/A

INT-CL (IPC): A61K039/44; C12Q001/00 ; G01N033/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP59203958A

BASIC-ABSTRACT: Reagent for measurement of alphas-proteinase inhibitor-kallikrein combinants in human body fluid consists of insoluble antibody (I) and enzyme labelling antibody (II). (I) is purified human adenokallikrein antibody which is bound to insoluble carrier by covalent bond or physical adsorption. (II) is anti-alpha-proteinase antibody obt'd. with purified human alpha-proteinase inhibitor as antigen and covalent-bound with enzyme.

USE/ADVANTAGE - Acute hepatitis patient showed specifically increased level of alpha-proteinase inhibitor-kallikrein in serum by using the reagent.

TTX:

REAGENT DIAGNOSE HEPATO COMPRISE PURIFICATION HUMAN ADENO
KALLIKREIN ANTIBODY
BOUND INSOLUBLE CARRY ENZYME LABEL ANTIBODY

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭59-203958

⑫ Int. Cl.³
G 01 N 33/54
A 61 K 39/44
C 12 Q 1/00

識別記号
庁内整理番号
H 7906-2G
7043-4C
8213-4B

⑬ 公開 昭和59年(1984)11月19日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ α_1 -プロテイナーゼインヒビター・カリクレイン結合物測定用試薬

⑮ 特 願 昭58-78158

⑯ 出 願 昭58(1983)5月6日

特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日
発行社団法人日本薬学会「日本薬学会第103
年会講演要旨集」において発表

⑰ 発 明 者 早川忍

愛知県春日井郡師勝町大字久地
野字権現92-1

⑱ 発 明 者 平野和行

岐阜市草陽町1丁目18番地の1

⑲ 発 明 者 杉浦衛

江南市古知野町久保見5番地

⑳ 出 願 人 株式会社スギウラ新薬開発研究
所

江南市古知野町久保見5番地

㉑ 出 願 人 マルコ製薬株式会社

名古屋市西区兎玉一丁目5番17
号

㉒ 代 理 人 弁理士 原田信市

明 細 書

1 発明の名称

α_1 -プロテイナーゼインヒビター・カリ
クレイン結合物測定用試薬

2 特許請求の範囲

1. 精製したヒトの α_1 -プロテイナーゼインヒビ
ターを抗原として得られる抗 α_1 -プロテイナー
ゼ抗体を酵素と共有結合により結合した酵素標
識抗体と、精製したヒト膵カリクレイン抗体を
共有結合または物理的吸着により不溶性担体に
結合した不溶化抗体からなるサンドウィッチ法
によるヒト体液中の α_1 -プロテイナーゼインヒ
ビター・カリクレイン結合物測定用試薬。

3 発明の詳細な説明

本発明はヒト体液中の α_1 -プロテイナーゼイ
ンヒビター・カリクレイン結合物(以下 α_1 -
PI・Kと称す)をサンドウィッチ法による酵素免
疫学的方法により測定する試薬に関する。

ヒト膵カリクレインがヒト血清中 α_1 -プロテ

ナーゼインヒビターと結合すること、及びヒト血
清中に膵カリクレインが存在することをGelger
らが報告している(文献 Reinhard Gelger,
Ulrike Stuckstedt, Barbara Clausnitzer
and Hans Fritz Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 362, 317-325 (1981)、Reinhard
Gelger, Barbara Clausnitzer, Edwin Fink
and Hans Fritz Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 361, 1795-1803 (1980))。しかしなが
ら、血清など体液中に分泌される α_1 -PI・Kの
測定法は、その含量が微量であるなどの理由に
より未だ確立されていない。

一方、従来から、体液中の微量成分を測定す
る手段として、抗原の検査を免疫学的に測定す
る方法(ゲル内免疫拡散法、補体結合法、赤血
球凝集反応など)が広く使用されているが、測
定感度の向上の面から放射性免疫測定法(ラジ
オイムノアッセイ)が用いられるようになって
きた。しかしながら、放射性免疫測定法は放射
性物質による環境汚染、人体への影響という面

で満足に行くものではない。

本発明に係る酵素免疫測定法は、抗原-抗体結合反応を利用して、酵素で標識した抗原もしくは抗体を使用し、抗原-抗体結合物を生成せしめ得られた物質の酵素活性を測定することにより、未知抗原量もしくは抗体量を判定しようとするものであつて、サンドウィッチ法もその一つである。このサンドウィッチ法は複数の抗原基を有する抗原に、複数の抗体が結合することを利用し、抗体-抗原標識抗体のサンドウィッチ型結合物を生成させ、その標識抗体の酵素活性を測定することにより、抗原量を判断しようとする方法であつて、他の免疫学的測定法に比較し、50～10,000倍感度が高い。

そこで、本発明者らは各種疾患における α_1 -PI-Kの変動を検索すべく、ヒト体液中の α_1 -PI-Kの酵素免疫測定法に関し、鋭意に研究を重ね、本発明物質を得ることに成功した。

本発明の試薬は、次のようにして製造することができる。

判明した。

したがつて、本発明物質は肝炎の診断に有用である。

次に実施例をあげて本発明を更に詳細に説明する。

実施例

(1) α_1 -PI 抗体の作製

α_1 -PI 1.5 mgを含む溶液1 mlをFreundのコンブリート・アジュバント(Complete adjuvant) 1 ml混合して作製した乳剤を家兎1匹に対して背中及び四肢の爪の間に注射する。第1回目の免疫から2週間後に第1回目と同様の乳剤を家兎の皮下に注射した。同様の免疫操作を4回繰り返した後、家兎の頸動脈より血液を採取し、37℃で30分間の加温後、3,000 rpmで15分間遠心を行い血清を得る。この血清につき56℃で30分の熱処理を行い、補体の非動化を行い、20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)を血清と同量加えて、

すなわち、ヒトの腺カリクレインをヒト尿より、DEAE-cellulose Sephadex G-100により精製均一化し、これを家兎に感作し抗血清を作製し、硫酸分画、DEAE-celluloseにより精製し抗体とした。この抗体をポリスチレンビーズには物理的吸着により、またガラスビーズ及びナイロンビーズについては共有結合により結合し、抗体結合不溶性担体を調製した。

一方で、先と同様に製造した抗 α_1 抗体に、使用する酵素に最適な化合物(例えば、 β -ガラクトシダーゼに対しm-マレインイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニイミドエステル、パーオキシダーゼに対しアルタルアルデヒドなど)、ついで酵素を反応させて酵素標識抗 α_1 -PI抗体を得る。この場合、化合物と酵素を先に反応させて後、抗体を結合させてもよい。

このようにして得られた抗腺カリクレイン抗体結合担体と酵素標識抗 α_1 -PI抗体を用い、急性肝炎患者血清中の α_1 -PI-Kを測定したところ、健康人に比べ、特異的に上昇することが

血清と同容量の飽和硫酸アンモニウムを加えて33%飽和とし、そこで析出する沈殿を12,000 rpm, 15分の遠心により集め、少量の同上緩衝液に溶解後、同緩衝液を用いて透析を行い、硫酸アンモニウムを完全に除いた。ここで得られた固分を20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)により緩衝化されたDEAE-セルロースカラム(2.5 x 15 cm)に添加し、カラムに吸着せず同上緩衝液により流出する固分を集め、20 mg/mlのタンパク量になるように同上緩衝液により希釈し、これを抗 α_1 -PI抗体とし、それぞれを分注し、凍結乾燥し-30℃で保存した。

(2) 腺カリクレイン抗体の作製

抗原に α_1 -PIの代わりに腺カリクレインを使用する以外は実施例(1)と同様に行つた。

(3) 抗腺カリクレイン抗体結合ポリスチレンビーズの調製

凍結乾燥した抗体40 mgを50 mM塩化ナトリウムを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液

(pH7.0) 400 ml に溶解し、この溶液中に、充分洗浄（強力な洗剤等を用いて）したポリスチレンビーズ（直径約 6.5 mm）を 1,000 ～ 10,000 個加え、30℃で2時間振とうした。抗体溶液を除いた後、0.1%ウシ血清アルブミンを含む同上緩衝液ビーズを洗浄後、同緩衝液を加え、さらに30℃で2時間振とうした。さらに同緩衝液で洗浄後、チオメルサール濃度が0.01%になるように加え、同一緩衝液中にビーズを保存した。

(4) 抗腺カリクレイン抗体結合ガラスビーズの調製

ガラスビーズ（直径約 4 mm）5,000 ～ 10,000 個を 10% γ -アミノプロピル・トリエトキシシランを含むトルエン溶液 200 ml に加え 30 分間室温で反応後、上記溶液をガラスフィルターにて除去し、トルエンにて充分洗浄後、アルキルアミン化ガラスビーズを乾燥した後 0.2% 抗腺カリクレイン抗体を含有する 20 mM リン酸緩衝液（pH7.4）500 ml 中に加えた

100 ml 中に加えて室温で15分反応させた。このビーズをさらに 20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0）500 ml で洗浄後、1 mg/ml の抗体を含む同上緩衝液 500 ml 中に加え、4℃で一晩反応を行い、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0）で充分洗浄した後、同上緩衝液中で 4℃にて保存した。

(6) β -ガラクトシダーゼ標識抗 α_1 -PI 抗体の調製

凍結乾燥した抗体 1.5 mg を 50 mM 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）1.5 ml に溶解し、これに 2% m -マレインイミドベンゾイル-N-ヒドロキシ・サフシニイミド・エステル（MBS）のジオキサン溶液 15 μ l 加え、30℃で1時間反応後、同上 50 mM 塩化マグネシウム、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）により緩衝化されたカラム容積約 30 ml のセファデックス G-25 カラムクロマトグラ

後、よく攪拌しながらグルタルアルデヒドを終濃度 0.1 ～ 1% になるように加え、4℃にて12時間振とう反応させた。ここで得られた抗腺カリクレイン抗体結合ガラスビーズを 0.1%ウシ血清アルブミンを含有する 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）にて充分に洗浄後、0.1%アジ化ナトリウムを含む同上緩衝液 500 ml 中に 4℃にて保存した。

(5) 抗腺カリクレイン抗体結合ナイロンビーズの調製

ナイロンビーズ（直径約 3 mm）1,000 ～ 10,000 個を 12.5% トリエチル・オキシニウム・テトラフルオロボレートを含むジクロルメタン溶液 100 ml に加え 25℃で15分間反応後、水酸化カルシウムで水分を除いたジクロルメタン 500 ml にて洗浄した。上記 O -アシル化ナイロンビーズをジアミノメタン 100 ml に加えて、室温で2時間反応後、0.2 M ホウ酸緩衝液（pH8.5）500 ml にて洗浄後、5%グルタルアルデヒドを含む同上緩衝液

ブザーにて、遊離の MBS を除き MBS 化抗体を得る。この MBS 化抗体溶液に *E. coli* 産生 β -ガラクトシダーゼ 1.5 mg を加えて、30℃で1時間反応後、最終濃度 1 mM になるようにメタノールを加えた。さらに β -ガラクトシダーゼ標識抗体を 0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム、0.1 M 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で緩衝化されたセファローズ 4B カラム（1.5 × 40 cm）に添加し、 β -ガラクトシダーゼ結合抗体を分離した。 β -ガラクトシダーゼ活性を有する抗体面分のピークを集め、 β -ガラクトシダーゼ標識抗体とし 4℃で保存した。

(7) パーオキシダーゼ標識抗 α_1 -PI 抗体の調製

西洋わさびから調製されたパーオキシダーゼ（POD）20 mg を 1.25%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液（pH7.5）0.3 ml に溶解し、室温で18時間反応させた。グルタルアルデヒド化 POD を 0.154 M 塩化ナトリウム

で緩衝化されたセファデックス G-25 カラム (1.5×60 cm) に添加し、遊離のグルタルアルデヒドを除いた。上記グルタルアルデヒド化 POD 溶液に抗体 10 μ g を溶解し、さらに 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) 0.2 ml を加え、4℃ で 24 時間反応後、0.2 M L-リジンを加え、室温で 2 時間反応させた。上記反応液を 0.154 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) により緩衝化されたセファデックス G-200 カラム (1.5×70 cm) に添加し、POD 標識抗体を得た。POD 活性を有する抗体画分を集め終濃度 0.01 % になるように、チオメルサルを加え 4℃ にて保存した。

実験例 1

(1) 抗腫カリクレイン抗体結合ポリスチレンビーズを用いる方法 (方法 1)

測定対象試料 20 μ l あるいは濃度既知標準 α_1 -PI-K 溶液 (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 2.4, 2.5, 5, 10, 20 ng/20 μ l) 20 μ l をとり、

■ は本法による α_1 -PI-K の標準曲線を示す。

(2) 抗腫カリクレイン抗体結合ポリスチレンビーズを用いる方法 (方法 2)

測定対象試料 20 μ l あるいは濃度既知の標準 α_1 -PI-K 溶液 (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 2.4, 2.5, 5, 10, 20 ng/20 μ l) 20 μ l をとり最終容量 220 μ l になるように 0.1 % ウシ血清アルブミン、0.01 % チオメルサル、10 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (バッファ P) を加えて、前記 (3) で得られた抗体結合ポリスチレンビーズをそれぞれ 1 個加え、37℃ で 2 時間反応後 1.5 ml のバッファ P にて 2 回洗浄する。このビーズに 200 μ l のバッファ P 及び前記 (6) の POD 標識抗体溶液 5 μ l を加え、37℃ で 2 時間反応し、1.5 ml のバッファ P にて 2 回洗浄を行つた。洗浄されたビーズを別の試験管にとり、0.3 % オルトフェニレンジアミン二塩酸塩、0.02 % 過酸化水素及び 0.01 % チオメルサルを含む 0.1 M クエン酸-リン

酸緩衝液 (pH 6.0) 0.3 ml を加えて 30℃ で 5 ~ 20 分間反応を行い、1 N 塩酸 2.5 ml を加えた後、492 nm で吸光度測定を行つた。第 2 図 ■ は本法による α_1 -PI-K の標準曲線を示す。

最終容量 220 μ l になるように 0.1 % ウシ血清アルブミン、0.1 % アジ化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (バッファ E) を加えて、前記 (3) で得られた抗体結合ポリスチレンビーズをそれぞれ 1 個加え、37℃ で 2 時間反応後、1.5 ml のバッファ E にて 2 回洗浄した。このビーズに 200 μ l のバッファ E 及び前記 (6) の β -ガラクトシダーゼ標識抗体溶液 5 μ l を加え、37℃ で 20 時間反応させ、1.5 ml のバッファ E にて 2 回洗浄を行つた。洗浄されたビーズを別の試験管に取り、200 μ l のバッファ E を加え、30℃ で 5 分間予備加温の後、0.3 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -ガラクトシド溶液 200 μ l を加えて 30℃ で 5 ~ 20 分間反応を行い、0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.3) を 2.5 ml 加えた後、励起波長 360 nm、発光波長 450 nm にて発光測定し、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定した。第 1 図

実験例 2

(1) 抗腫カリクレイン抗体結合ガラスビーズを用いる方法 (方法 1)

前記 (4) で調製した抗腫カリクレイン抗体結合ガラスビーズを使用する以外は実験例 1 の (1) と同様に操作を行つた。ただし、本法による α_1 -PI-K の標準曲線を第 1 図 b に示した。

(2) 抗腫カリクレイン抗体結合ガラスビーズを用いる方法 (方法 2)

前記 (4) で調製した抗腫カリクレイン抗体結合ガラスビーズを使用する以外は実験例 1 の (2) と同様に操作を行つた。ただし、本法による α_1 -PI-K の標準曲線を第 2 図 b に示した。

実験例 3

- (1) 抗腺カリクレイン抗体結合ナイロンビーズを用いる方法 (方法 1)

前記(5)で調製した抗腺カリクレイン結合ナイロンビーズを使用する以外は実験例 1 の(1)と同様に操作を行つた。ただし、本法による α_1 -PI・K の標準曲線を第 1 図 c に示した。

- (2) 抗腺カリクレイン抗体結合ナイロンビーズを用いる方法 (方法 2)

前記(5)で調製した抗腺カリクレイン抗体結合ナイロンビーズを使用する以外は実験例 1 の(2)と同様に操作を行つた。ただし、本法による α_1 -PI・K の標準曲線を第 2 図 c に示した。

各実験例における標準 α_1 -PI・K 及び血清における同時再現性 (同一試料を同時に測定したときのバラツキの割合) を第 1 表に、日差変動 (日をかえて同一試料を測定したときのバラツキの割合) を第 2 表に示す。

1. 各検体の同時再現は 5 種の濃度の異なる検体の 10 回繰り返し実験を行つた結果である。
2. 各検体の日差変動は 5 種の濃度の異なる検体を 10 日間繰り返し実験を行つた結果である。

各種疾患患者血清中の α_1 -PI・K の本酵素免疫測定法による測定結果

各種疾患患者血清中の α_1 -PI・K 量を第 3 図に示した。図中()内の数字は症例数を表わす。この結果、血清中 α_1 -PI・K 量は急性肝炎患者で特異的に上昇していた。

4 図面の簡単な説明

第 1 図及び第 2 図は本発明の実験例 1~3 における既知濃度標準の α_1 -PI・K 量を横軸に對数で取り、 β -ガラクトシダーゼを標識酵素として用いた場合は酵素活性を、POD を用いた場合は POD 活性を縦軸にとつたグラフを示すもので

第 1 表 β -ガラクトシダーゼ標識抗体を用いた α_1 -PI・K の酵素免疫測定法の再現性

検体	測 定 系					
	β -Gal-ポリスチレン		β -Gal-ガラス		β -Gal-ナイロン	
	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²
標準	6.8	—	7.5	—	9.3	—
血清	8.0	15.5	7.8	19.2	8.9	20.3

C. V. % : 変動係数 (coefficient of variation)

$$C. V. = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100 \%$$

第 2 表 POD 標識抗体を用いた α_1 -PI・K の酵素免疫測定法の再現性

検体	測 定 系					
	POD-ポリスチレン		POD-ガラス		POD-ナイロン	
	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²
標準	7.5	—	7.8	—	9.0	—
血清	9.0	15.8	10.0	17.8	10.2	18.2

β -Gal : β -ガラクトシダーゼ標識抗体

POD : POD 標識抗体

ある。

第 3 図はそれぞれ本発明の試薬を用いた各種疾患患者の血清中の α_1 -PI・K 量を示すグラフである。

特 許 出 願 人 株式会社スギウラ新薬開発研究所
代理人 弁理士 原 田 信 市

図 1

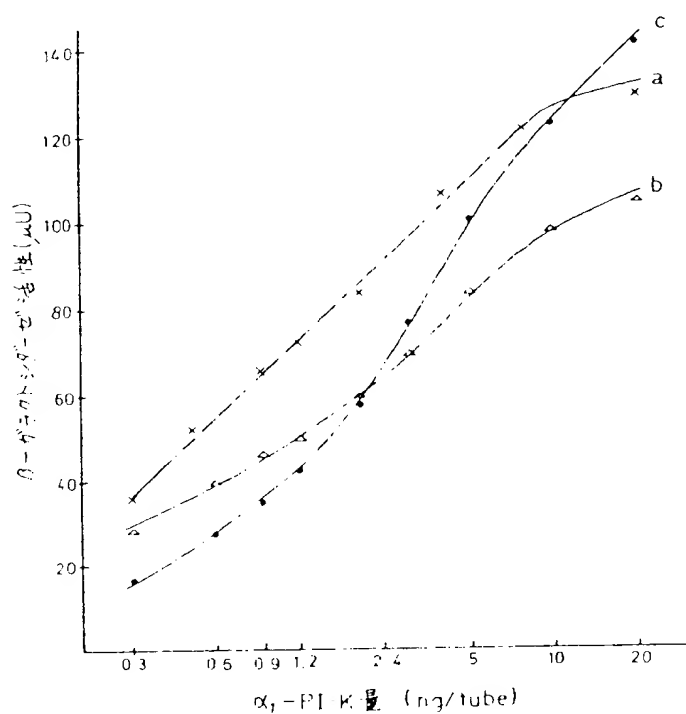


図 2

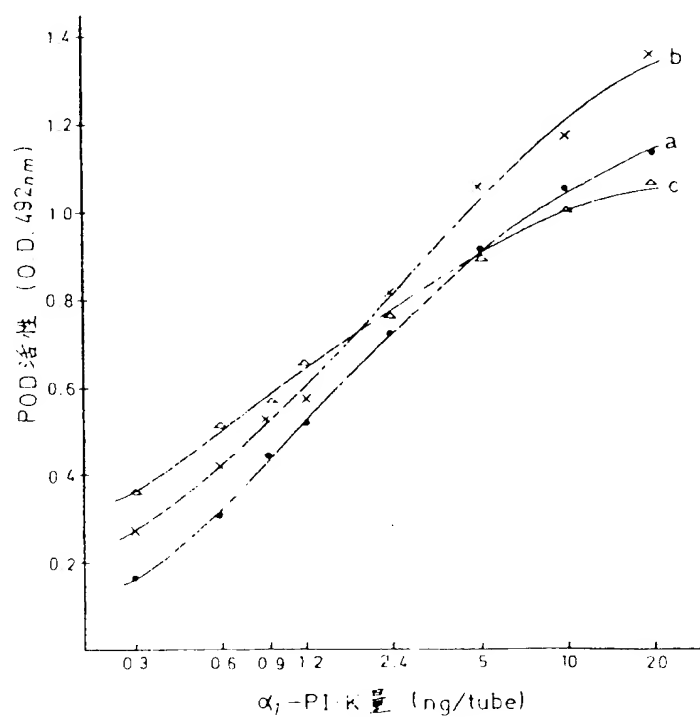


表 3

